

UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



**CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES DE
NEMATODOS DEL GÉNERO *Meloidogyne*
ASOCIADAS A LOS CULTIVOS DE *Capsicum* Y
ESPÁRRAGO EN LAS PRINCIPALES ZONAS
PRODUCTORAS DEL NORTE DEL PERÚ**

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO**

PRESENTADA POR:

Br. CINTHIA MARÍA COSSÍO GÓMEZ

**PIURA – PERÚ
2018**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



**CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES DE NEMATODOS DEL
GÉNERO *Meloidogyne* ASOCIADAS A LOS CULTIVOS DE
Capsicum Y ESPÁRRAGO EN LAS PRINCIPALES ZONAS
PRODUCTORAS DEL NORTE DEL PERÚ**

TESIS

**PRESENTADA A LA FACULTAD DE AGRONOMÍA PARA
OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO**

Dr. CÉSAR AUGUSTO MURGUÍA REYES
ASESOR

Ing. ISRAEL LIMA MEDINA Ph. D.
CO - ASESOR

Br. CINTHIA MARÍA COSSÍO GÓMEZ
TESISTA

PIURA – PERÚ
2018

DECLARACIÓN JURADA DE AUTENTICIDAD DE LA TESIS

Yo: **Br. CINTHIA MARÍA COSSÍO GÓMEZ**, identificado con DNI N° 71498501,
Bachiller de la Escuela Profesional de Agronomía, de la Facultad de Agronomía y
domiciliado en Prolongación Av. Grau N° 2361 Urb. Piura, Provincia de Piura,
Departamento de Piura.
Celular: 957855088
Correo: cima719@hotmail.com

DECLARO BAJO JURAMENTO: que la tesis que presento es auténtica e inédita, no
siendo copia parcial ni total de una tesis desarrollada y/o realizada en el Perú o en el
extranjero, en caso contrario de resultar falsa la información que proporciono, me sujeto
a los alcances de lo establecido en el Art. N° 411, del código penal concordante con el
Art. 32 de la ley N° 27444, y ley del Procedimiento Administrativo General y las Normas
Legales de Protección a los Derechos de Autor.

En fé de lo cual firmo la presente.

Piura, Enero del 2018.

.....

DNI N° 71498501



UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



**CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES DE NEMATODOS DEL
GÉNERO *Meloidogyne* ASOCIADAS A LOS CULTIVOS DE
Capsicum Y ESPÁRRAGO EN LAS PRINCIPALES ZONAS
PRODUCTORAS DEL NORTE DEL PERÚ**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO

Br. CINTHIA MARÍA COSSÍO GÓMEZ

APROBADA POR:

Dr. EDGAR RORÍGUEZ GÁLVEZ
PRESIDENTE

ING. ANGELINO CORDOVA PEÑA MSc.
VOCAL

ING. RENE AGUILAR ANCCOTA
SECRETARIO

PIURA – PERÚ
2018



UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
COMISION DE INVESTIGACION AGRICOLA



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS
063-2017-CIAFA-UNP

Los miembros del jurado calificador que suscriben, congregados para estudiar el Trabajo de Tesis denominado **"CARACTERIZACION DE POBLACIONES DE NEMATODOS DEL GÉNERO *Meloidogyne* ASOCIADAS A LOS CULTIVOS DE CAPSICUM Y ESPARRAGO EN LAS PRINCIPALES ZONAS PRODUCTORAS DEL NORTE DEL PERU"**, conducido por la **BR. CINTHIA MARIA COSSIO GOMEZ**, asesorada por el **Dr. Cesar Murguía Reyes y Co** – asesorada por el **Ing. Israel Lima Medina PH.D.**

Luego de oídas las observaciones y respuestas a las preguntas formuladas, la declaran **Aprobada**, en consecuencia queda en condiciones de ser calificado **APTO** para gestionar ante el Consejo Universitario de la Universidad Nacional de Piura, el Título Profesional de Ingeniero Agrónomo de conformidad con lo estipulado en el artículo N° 171, inciso 2° del Estatuto General de la Universidad Nacional de Piura.

Piura, 11 de Diciembre del 2017.

Dr. Edgar Rodríguez Gálvez
Presidente

Ing. Angelino Córdova Peña MSc.
Vocal

Ing. Rene Aguilar Ancota
Secretario

DEDICATORIA

A Dios, por haberme permitido llegar hasta este punto y brindarme salud para lograr mis objetivos.

A mi madre, por el apoyo incondicional que me ha dado, por ser mi ejemplo y por su esfuerzo, comprensión y paciencia durante todo este proceso.

A mi familia y amigos, por los consejos y la ayuda que siempre estuvieron dispuestos a brindarme.

AGRADECIMIENTOS

A Innovate Perú (Ministerio de la Producción) por el financiamiento del presente trabajo mediante el Proyecto titulado: “Diversidad biológica de poblaciones peruanas de *Meloidogyne* spp.: Descripción y caracterización de especies a través del uso de isoenzimas y marcadores moleculares” correspondiente al Convenio N° 346-PNICP-BRI-2015.

Al Dr. César A. Murguía Reyes por haberme ofrecido trabajar con él en este Proyecto, por su guía, conocimientos, paciencia y apoyo total durante todo este tiempo.

Al Dr. Israel Lima Medina por haber permitido mi participación en este Proyecto y por los conocimientos que compartió.

A mis compañeros del proyecto, por darme su apoyo siempre y por cada experiencia que vivimos juntos.

RESUMEN

Los “nematodos formadores de agallas radiculares” *Meloidogyne* spp. causan daños en la producción de hortalizas en el Perú, especialmente en condiciones áridas y cálidas como en la costa norte del país. En ese sentido, es necesario realizar estudios más profundos para determinar la ocurrencia, distribución e identificación de especies de este nematodo en algunas de las principales hortalizas tales como: capsicums, espárrago, apio y melón. En la presente investigación se realizaron muestreos nematológicos en diferentes regiones productoras de éstos cultivos para obtener poblaciones e identificar las especies de *Meloidogyne* a través del análisis de isoenzimas, la caracterización morfológica del diseño perineal de hembras y cuantificar la densidad poblacional del nematodo. Se obtuvieron 9 poblaciones del nematodo procedentes de raíces y suelo de plantas de: capsicums, espárrago, apio, melón y alcachofa en diferentes zonas productoras de las regiones de Piura, Lambayeque y La Libertad. Se identificaron tres especies de *Meloidogyne* asociadas a estos cultivos en la costa norte del Perú. *M. arenaria*, con fenotipo A2 es la especie más frecuente, seguida de *M. incognita* con fenotipo I2. En el cultivo de melón procedente del distrito de Chulucanas, Piura se identificaron *M. ethiopica* con el fenotipo E3 y *M. arenaria*. *M. incognita* asociada al cultivo de apio. En los cultivos de capsicums procedentes de las regiones de Piura y Lambayeque se identificaron *M. incognita* y *M. arenaria*. En los cultivos de alcachofa y espárrago procedentes de la región La Libertad sólo se identificó *M. arenaria*.

Palabras clave: Nematodo del nudo, pimientos, hortalizas, isoenzimas.

ABSTRACT

The root-knot nematode, *Meloidogyne* spp. cause damages in the production of vegetables in Peru, especially in arid and warm conditions like in the north coast of the country. Therefore, it is necessary to carry out more in-depth studies to determine the occurrence, distribution and identification of species of this nematode, some of the main vegetables such as: capsicums, asparagus, celery, melon and artichoke. In the present study, nematological samplings were carried out in different regions producing these crops to obtain populations and identify the *Meloidogyne* species through isoenzyme analysis, the morphological characterization of the perineal design of females and quantify the population density of the nematode. 9 populations of the nematode were obtained from roots and soil of plants of: capsicums, asparagus, celery and melon in different producing areas of the regions of Piura, Lambayeque and La Libertad. Three *Meloidogyne* species associated with different horticultural crops on the north coast of Peru were identified. *M. arenaria*, with phenotype A2 is the most frequent species, followed by *M. incognita* with phenotype I2. In the melon crop from the Chulucanas district, Piura, *M. ethiopica* was identified with the phenotype E3 and *M. arenaria*. *M. incognita* is associated with the cultivation of celery. In capsicum crops from regions of Piura and Lambayeque, *M. incognita* and *M. arenaria* were identified. In the artichoke and asparagus crops from the La Libertad region only *M. arenaria* was identified.

Key words: root-knot nematode, peppers, vegetables, isoenzyme.

ÍNDICE GENERAL

	Página
CAPÍTULO 1	
1. Introducción	1
1.1. Objetivo General	2
1.2. Objetivos Específicos	2
1.3. Hipótesis General	2
1.4. Hipótesis Específicas	2
CAPÍTULO 2	
2. Revisión bibliográfica	3
2.1. Importancia de las hortalizas	3
2.2. Nematodos asociados a hortalizas	3
2.3. <i>Meloidogyne</i> spp	4
2.3.1. Ciclo de Vida	5
2.3.2. Formas de Reproducción	8
2.3.3. Factores del ambiente que afectan el desarrollo del nematodo	9
2.3.4. Distribución y hospedantes	10
2.3.5. Sintomatología	10
2.4. Identificación de especies de <i>Meloidogyne</i>	11
2.4.1. Uso de patrones perineales	11
2.4.2. Análisis electroforéticos de proteínas e isoenzimas	12
CAPÍTULO 3	
3. Material y métodos	13
3.1. Período de ejecución y ubicación geográfica de las zonas muestreadas para la obtención de poblaciones de <i>Meloidogyne</i> spp.	13
3.2. Muestreos	13
3.3. Procesamiento y extracción de nematodos de muestras de suelo	14
3.4. Procesamiento y extracción de huevos más J2 de <i>Meloidogyne</i> spp. de raíces	14
3.5. Aislamiento de poblaciones	15
3.5.1. Obtención de poblaciones en plantas de tomate	15

3.5.2. Purificación de poblaciones de <i>Meloidogyne</i> spp.	15
3.6. Observación de diseños perineales hembras de <i>Meloidogyne</i> spp.	16
3.7. Caracterización bioquímica para especies de <i>Meloidogyne</i>	16
CAPÍTULO 4	
4. Resultados y discusión	18
4.1. Obtención de poblaciones de <i>Meloidogyne</i> spp.	18
4.2. Caracterización bioquímica	23
4.3. Caracterización morfológica	27
CAPÍTULO 5	
5. Conclusiones	29
CAPÍTULO 6	
6. Recomendaciones	30
CAPÍTULO 7	
7. Referencias bibliográficas	31
ANEXOS	36

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Ubicación geográfica de las principales zonas productoras de los cultivos de capsicum, espárrago, alcachofa, melón y apio.	13
Cuadro 2. Niveles de infestación en suelo e inóculo en 9 poblaciones de <i>Meloidogyne</i> spp. procedentes de cultivos hortícolas en diferentes zonas de la costa norte del Perú.	18
Cuadro 3. Fenotipos isoenzimáticos de esterasa observados en 9 poblaciones de <i>Meloidogyne</i> spp. provenientes de plantas de cultivos hortícolas colectados en diferentes zonas de la costa norte del Perú.	24

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Procedimiento para la obtención de poblaciones de <i>Meloidogyne</i> .	16
Figura 2. Localización y distribución de especies de <i>Meloidogyne</i> en los cultivos de melón, pimiento piquillo y páprika en diferentes sectores productores de la región Piura.	19
Figura 3. Localización y distribución de <i>M. incognita</i> en el cultivo de pimiento piquillo en la región Lambayeque.	20
Figura 4. Localización y distribución de especies de <i>Meloidogyne</i> en los cultivos de espárrago y alcachofa en la región La Libertad.	21
Figura 5. Plantas de alcachofa (a), ají páprika (b) y espárrago (c); presentando síntomas de amarillamiento en hojas, menor crecimiento y agallas en raíces causadas por <i>Meloidogyne</i> spp.	22
Figura 6. Plantas de apio (a) y melón (b), presentando síntomas de amarillamiento en hojas, menor crecimiento y agallas en raíces causadas por <i>Meloidogyne</i> spp	23
Figura 7. Fenotipos de esterasa detectados en 9 poblaciones de <i>Meloidogyne</i> spp. provenientes de los cultivos de melón, pimiento, ají, apio, alcachofa y espárrago de	

diferentes regiones geográficas de la costa norte del Perú. 26

M. javanica (J3); *M. arenaria* (A2), *M. incognita* (I2) y *M. ethiopica* (E3).

Figura 8. Fenotipos de esterasa (Est) detectados en 9 poblaciones de *Meloidogyne* spp. aisladas de los cultivos de melón, pimiento, ají, apio, alcachofa y espárrago de diferentes regiones geográficas de la costa norte del Perú. 27

Figura 9. Patrones perineales de tres especies de *Meloidogyne*. A, B: *M. incognita*; C: *M. arenaria* y D: *M. ethiopica*; detectadas en diferentes regiones geográficas y cultivos hortícolas en la costa norte del Perú 28

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Figura 10. Procedimiento y extracción de nematodos de muestras de suelo.	37
Figura 11. Procedimiento para caracterización bioquímica para especies de <i>Meloidogyne</i> .	37

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

El Perú es uno de los principales exportadores de hortalizas frescas a nivel mundial, en el año 2016 las exportaciones agrarias superaron los 5,790 millones de dólares; los capsicums, espárragos y alcachofas en estado fresco y en conservas representaron los productos más demandados. El desarrollo de la actividad agroexportadora de estos cultivos se encuentra ubicada en toda la costa peruana, principalmente en el norte del país (La Libertad, Lambayeque y Piura) y la región Ica (ADEX, 2014).

Las hortalizas están expuestas al ataque de varias enfermedades causadas principalmente por hongos, bacterias, virus y nematodos. Los nematodos son los más importantes parásitos de las raíces de estos cultivos, el nematodo conocido como el “nematodo formador de agallas radiculares”, *Meloidogyne* spp. es endémico en muchas zonas productoras, se encuentra ampliamente diseminado en suelos de textura arenosa y causa niveles de daños que inciden en la disminución de los rendimientos en pocos años. Las especies de *Meloidogyne* afectan a las plantas al debilitar las puntas de las raíces, inhibiendo su desarrollo debido a la formación de agallas las cuales, atrofian el sistema radicular, disminuyendo la absorción de agua y nutrientes (Siddiqui, 2001). *Meloidogyne* spp. tienen un amplio y numeroso rango de plantas hospedantes, muchas familias de plantas son especies susceptibles al nematodo, es común que una especie de *Meloidogyne* pueda afectar un gran número de hospedantes y a su vez un mismo hospedante ser afectado por varias especies del nematodo, causándose un solapamiento.

Considerándose la importancia que representan para el país las exportaciones de hortalizas y debido también al daño que ocasionan *Meloidogyne* spp. en la producción de estos cultivos, es necesario realizar estudios más profundos para determinar la ocurrencia, distribución e identificación de especies de “nematodos de las agallas radiculares” en algunas de las principales hortalizas tales como: capsicums, espárrago, apio y melón en el norte del Perú.

1.1. OBJETIVO GENERAL

- a. Caracterizar poblaciones de *Meloidogyne* asociadas a los cultivos de capsicum, espárrago, alcachofa, melón y apio en zonas productoras de las regiones de Piura, Lambayeque y La Libertad.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Cuantificar la densidad poblacional de *Meloidogyne* spp. asociadas a los cultivos de capsicum, espárrago, alcachofa, melón y apio en zonas productoras de las regiones de Piura, Lambayeque y La Libertad.
- b. Caracterizar morfológicamente los diseños perineales de hembras de *Meloidogyne* spp. de poblaciones aisladas de los cultivos de capsicum, espárrago, alcachofa, melón y apio.
- c. Identificar especies de *Meloidogyne* procedentes de poblaciones aisladas de los cultivos de capsicum, espárrago, alcachofa, melón y apio a través del análisis de isoenzimas.

1.3. HIPÓTESIS GENERAL

- a. Las poblaciones de *Meloidogyne* asociadas a los cultivos de capsicum, espárrago, alcachofa, melón y apio presentan diversidad biológica y poblacional.

1.4. HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

- a. *Meloidogyne* spp. presenta diferentes niveles poblacionales en los cultivos de capsicum, espárrago, alcachofa, melón y apio muestreados en las regiones de Piura, Lambayeque y La Libertad.
- b. Las hembras de *Meloidogyne* spp. aisladas de los cultivos capsicum, espárrago, alcachofa, melón y apio presentan distintos diseños perineales.
- c. El análisis de isoenzimas identifica especies de *Meloidogyne* de poblaciones aisladas de los cultivos de capsicum, espárrago, alcachofa, melón y apio.

CAPÍTULO 2

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Importancia de las hortalizas

Las hortalizas son uno de los más importantes componentes de la dieta diaria de las personas: La producción de estos cultivos son de alto valor monetario para pequeños y grandes productores. Las hortalizas, especialmente las verduras, son ricas en proteínas, vitaminas, minerales y fibra; siendo la principal fuente de proteínas en los trópicos húmedos. Los principales productores de hortalizas en los trópicos en orden de importancia son: Asia, África, América del Sur y Centro América. Una cantidad significativa de producción de hortalizas también se producen en los subtrópicos de todos los continentes. El aumento de la producción de hortalizas está asociado con los grandes avances en la producción y tecnología de procesamiento. Además, los métodos modernos de mejoramiento genético apoyados por nuevas técnicas moleculares están dando grandes pasos para acortar el tiempo de desarrollo de los cultivares con resistencia a los nematodos, insectos, enfermedades y factores abióticos, así como en la mejora del valor nutritivo de los cultivos hortícolas. La producción de hortalizas en todos los subtrópicos es altamente dependiente de buen control de nematodos. En muchos casos, el control de nematodos es un pre-requisito para asegurar una producción exitosa (Sikora y Fernández, 2005).

2.2. Nematodos asociados a hortalizas

Los nematodos parásitos de plantas son un factor limitante muy importante en la producción de hortalizas y, en muchas áreas, requiere un uso extensivo de pesticidas. En general, los nematodos son menos importantes bajo sistemas de producción amplios y variados, con cultivos intercalados en una agricultura de subsistencia, así como sistemas agrícolas comerciales con un programa de rotaciones de cultivos. Sin embargo, los nematodos causan daños significativos en sistemas intensivos de producción, por ejemplo, en cultivos protegidos donde se practica el monocultivo, o

en sistemas de producción de campo donde la fumigación del suelo es seguida por una secuencia de siembra con una serie de hospedantes susceptibles (Sikora y Fernández, 2005).

Entre las regiones tropicales y templadas hay grandes diferencias en las comunidades de nematodos parásitos de plantas, en estas regiones los cultivos de hortalizas se reportan como hospedantes de más de una de las especies más frecuentes de “nematodos de las agallas de las raíces”, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria*. Otros nematodos como *Ditylenchus dipsaci* y especies de *Heterodera* son importantes en climas templados, y sólo de importancia local en los trópicos calientes, pero pueden ser un problema en las estaciones frías de los subtrópicos y en las hortalizas cultivadas a mayores altitudes. Los “nematodos de las agallas radiculares” predominantes en las regiones tropicales son poco comunes en regiones templadas (Taylor y Sasser, 1978). Mayores daños a los cultivos se presentan en las regiones cálidas y en los cultivos de verano que en las regiones de los trópicos altos (Noe y Sikora, 1990).

Rotylenchulus reniformis y *Paratrichodorus minor* son otras especies de nematodos económicamente importantes, algunas veces se pasan por alto, debido al desconocimiento de los síntomas que producen. *Heterodera schachtii*, *Nacobbus aberrans*, *Belonolaimus longicaudatus*, *Xiphinema* spp. y *Tylenchorhynchus brassicae* también podrían producir serios daños a las hortalizas (Sikora y Fernández, 2005).

2.3. *Meloidogyne* spp.

El género *Meloidogyne* Goeldi, 1892 (Nematoda: Heteroderidae) comprende a un grupo de nematodos parásitos de plantas de amplia distribución en el mundo, son polífagos y endoparásitos de raíces, se conocen como los “nematodos formadores de nódulos o agallas radiculares”. Se han descrito más de 100 especies válidas, pero se considera que cuatro son las especies importantes y destructivas que causan el 90 % del daño estimado en el mundo (Sasser, 1980; Eisenback et al., 1981; Siddiqi, 2000; Hunt y Handoo, 2009).

2.3.1. Ciclo de Vida

Los huevos de *Meloidogyne* spp., se encuentran inmersos en una masa gelatinosa, la cual los mantiene juntos y los protege tanto de las condiciones ambientales extremas como de depredadores. Las masas gelatinosas están compuestas por glicoproteínas y también se les atribuye propiedades antimicrobianas. Generalmente, están depositadas en la superficie de los nódulos, pero algunas veces se encuentran directamente sobre la superficie o dentro del tejido de la raíz de la planta hospedante. La masa de huevos es inicialmente suave, pegajosa y hialina, pero se hace más firme y de color marrón oscuro con el tiempo (Moens *et al.*, 2009). Se pueden encontrar más de 1000 huevos en una masa, que puede ser más grande que el cuerpo de la hembra (Taylor y Sasser, 1983).

El desarrollo del huevo comienza breves horas después de la ovoposición, resultando en 2, 4, 8, 16 a más células, hasta que se ve el primer estado juvenil completamente formado, enrollado y con un estilete. Se puede mover dentro del huevo pero no es muy activo. La primera muda tiene lugar en el huevo y no es difícil distinguir la cutícula del primer estado juvenil, sobresaliendo más allá de la cabeza del segundo estado juvenil (J2). Poco después, este emerge rompiendo la membrana flexible del huevo, por medio de pinchazos repetidos con el estilete. La eclosión de los huevos es influenciada por la temperatura y ocurre sin requerir ningún estímulo por parte de la raíz de la planta, sin embargo, los exudados radiculares algunas veces estimulan la eclosión (Taylor y Sasser, 1983; Karssen y Moens, 2006).

El juvenil de segundo estado que ha emergido, se mueve a través del suelo en busca de una raíz de la que pueda alimentarse. Su capacidad de sobrevivir se ve reforzada por varias adaptaciones fisiológicas y bioquímicas, incluyendo la quiescencia y la diapausa, y las reservas de lípidos que prolongan su viabilidad hasta que llega e invade la planta hospedante (Moens *et al.*, 2009). La búsqueda de la raíz es al azar hasta que se acerca a unos cuantos centímetros. Luego, son atraídos por los exudados radiculares, acumulándose y penetrando la raíz por la zona de elongación debajo del punto de crecimiento. Se considera que el dióxido de

carbono es el factor más importante para atraer a los juveniles de segundo estado (Taylor y Sasser, 1983; Hussey y Janssen, 2002; Karssen y Moens, 2006).

El juvenil de segundo estado penetra la raíz a través de algún punto de la zona subapical donde la endodermis presenta escaso desarrollo y no constituye una barrera física para el ingreso hacia el interior (Wyss *et al.*, 1992). El nematodo avanza hasta el tejido cortical y una vez allí la migración continúa intercelularmente hasta llegar al cilindro vascular en diferenciación. El avance a través del espacio intercelular se realiza recurriendo a la separación de la laminilla media por medios mecánicos a través de golpes de estilete, sin haberse precisado hasta la fecha si también concurren mecanismos enzimáticos en el proceso. Cada juvenil establece su sitio permanente de alimentación una vez que alcanza el cilindro vascular (Hussey y Williamson, 1998). Este sitio consiste en un conjunto de grandes células modificadas llamadas células gigantes, caracterizadas por la presencia de muchos núcleos de gran tamaño, altamente lobulados, con nucléolos prominentes, un alto número de orgánulos, citoplasma denso con altas tasas metabólicas y paredes engrosadas e invaginadas. Los nematodos absorben los nutrientes del citoplasma directamente o a través de tubos de alimentación sintetizados con tal propósito mediante las secreciones procedentes de las glándulas subesofágicas dorsales (Hussey y Mims, 1991).

Varios estudios han documentado los efectos de la infección por nematodos en la expresión génica. Algunos estudios en las células gigantes han revelado que el ARNm de algunos genes puede estar presente en niveles muchas veces mayor que en células de una raíz no infectada (Ramsey *et al.*, 2004; He *et al.*, 2005). También se ha reportado que se incrementa los niveles de enzimas oxidoreductasas, indicando un aumento en la actividad metabólica (Hussey y Janssen, 2002; Karssen y Moens, 2006).

Los nematodos del nódulo de la raíz secretan a través de su cutícula, enzimas antioxidantes que son producidas en la hipodermis y protegen al nematodo de la respuesta oxidativa del hospedante frente a la infección. Así también, las proteínas producidas y secretadas por las células de las glándulas esofágicas dentro de la planta hospedante por medio del estilete, son señales moleculares que

desencadenan la activación de rutas de señalización, que conducen a la supresión de la defensa del hospedante y a la inducción de células gigantes (Abad *et al.*, 2009). Mientras se están formando las células gigantes y los nódulos, aumenta el ancho del nematodo y hay una dilatación considerable de las glándulas esofágicas. Las células del primordio genital se dividen y éste se agranda haciéndose notorio, dos ramificaciones en la hembra o formando un cuerpo alargado en el macho (Taylor y Sasser, 1983).

Cuando se completan la segunda y tercera muda en la hembra, evidenciadas por las dos cutículas desprendidas, el estilete y el bulbo esofágico medio desaparecen. Poco después de la cuarta muda el estilete y el bulbo medio son regenerados, se forman el útero y la vagina y el patrón perineal se hace visible. La hembra de la cuarta etapa continúa aumentando de grosor y un poco más de longitud, sufriendo la última muda y desarrollándose como hembra adulta, de forma piriforme. Las hembras pueden producir huevos por dos a tres meses y viven algún tiempo más después de que cesa la producción de huevos. El ciclo termina cuando la hembra pone su primer huevo (Taylor y Sasser, 1983).

Después de la segunda y tercera muda en el macho, el estilete no es visible, el bulbo esofágico medio se ha degenerado y sólo la gónada se ha alargado. Luego ocurre una rápida metamorfosis: el cuerpo alargado se desarrolla dentro de la cutícula, completo con estilete, esófago con bulbo medio, espículas, y esperma en los testículos. El macho de la cuarta etapa es vermiforme y sufre una última muda y emerge de la raíz ya como adulto. No hay evidencia de alimentación por parte de machos adultos y pueden ser encontrados en especies partenogenéticas cuando las condiciones son desfavorables para el desarrollo de la hembra, por ejemplo, cuando las densidades son muy altas y hay una limitación del suministro de alimentos. Los machos probablemente viven sólo semanas (Taylor y Sasser, 1983; Moens *et al.*, 2009).

2.3.2. Formas de Reproducción

Existen tres tipos de reproducción dentro del género *Meloidogyne*: (a) anfimixis, en el cual el esperma de los machos fertiliza los ovocitos en las hembras y posteriormente se produce una meiosis, (b) partenogénesis meiótica facultativa, en el cual en presencia de machos se produce una anfimixis, pero en su ausencia, se lleva a cabo una meiosis en los ovocitos, con dos de sus núcleos, con una reducción de complemento cromosómico (el pronúcleo y el segundo cuerpo polar), posteriormente se fusionan (automixis), y (c) partenogénesis mitótica obligada, donde los machos no están involucrados y uno de los dos núcleos producidos durante la división mitótica inicial dentro del ovocito se deteriora y el otro se convierte en el precursor del embrión posterior (apomixis) (Chitwood y Perry, 2009).

Las poblaciones de una misma especie de *Meloidogyne* pueden ser diferentes en el modo de reproducción, por ejemplo, 29 de las 32 poblaciones estudiadas de *M. hapla* se reprodujeron por partenogénesis meiótica facultativa, las otras por partenogénesis mitótica (Chitwood y Perry, 2009).

Tanto en el género *Meloidogyne*, como en *Globodera* y *Heterodera*, los cromosomas sexuales están ausentes y la proporción de machos y hembras puede estar influida por factores ambientales. En las especies que se reproducen por partenogénesis meiótica y mitóticas, el hacinamiento, la escasez de alimentos, las temperaturas extremas u otras tensiones ambientales adversas, pueden dar lugar a la formación de machos por inversión sexual. Estos machos raramente inseminan hembras, e incluso cuando lo hacen, una división mitótica en el ovocito inicia la embriogénesis sin fusión con el núcleo de espermatozoide (Chitwood y Perry, 2009).

2.3.3. Factores del ambiente que afectan el desarrollo del nematodo

La temperatura, la humedad, la porosidad del suelo, la disponibilidad de oxígeno y la presencia de toxinas pueden limitar o detener el movimiento, el desarrollo y la eclosión de huevos de los nematodos noduladores de la raíz (Curtis *et al.*, 2009; Evans y Perry, 2009).

La temperatura no sólo afecta la tasa de multiplicación del nematodo sino también su distribución, especialmente en relación con la capacidad de sobrevivir a los efectos de alta o baja temperatura. Dentro del género *Meloidogyne* hay dos grupos, termófilos y criófilos, según su capacidad de sobrevivir las transiciones de fase de lípidos que se producen a 10 °C. *M. chitwoodi*, *M. hapla* y *M. naasi* son criófilos y pueden sobrevivir en el suelo a temperaturas de hasta por debajo de 10 °C, mientras que *M. javanica*, *M. arenaria* y probablemente *M. exigua* son termófilos y no sobreviven en el suelo a temperaturas inferiores a 10 °C (Evans y Perry, 2009).

Wallace (1964), reconoció el papel esencial desempeñado por la humedad del suelo en la supervivencia y eclosión de los huevos de *Meloidogyne*. La sequía excesiva puede frenar o incluso matar al nematodo, igual ocurre con el encharcamiento prolongado que, por falta de oxígeno en el suelo, el nematodo es también afectado. Todos los juveniles de segundo estado requieren una película de agua de cierto grosor para su circulación en el suelo (Curtis *et al.*, 2009).

La textura del suelo es otro factor de importancia, la distribución y la severidad del ataque del nematodo dependen de ella. El daño y pérdidas de producción por nematodos noduladores de la raíz son generalmente más severos sobre suelos de textura arenosa (Wallace, 1964), debido que, en suelos pesados, la eclosión disminuye y el desplazamiento del nematodo se hace más lento.

2.3.4. Distribución y hospedantes

Las especies de *Meloidogyne* son parásitos obligados con una amplia distribución geográfica y rango de hospedantes. Tienen la capacidad de infectar raíces de numerosas plantas, con un rango de hospedantes que comprende más de 3.000 especies vegetales (Abad *et al.*, 2003), por lo tanto, se pueden considerar en general como polífagos. *M. incógnita*, *M. arenaria*, *M. javanica* y *M. hapla* son las especies generalizadas que representan el 95 % de los nematodos formadores de agallas radicales. Las primeras tres especies son de regiones tropicales y templadas, mientras que *M. hapla* se encuentra en climas fríos (Lamberti, 1979).

2.3.5. Sintomatología

El daño que ocasionan a las plantas se debe principalmente a la alteración de los tejidos vasculares de la raíz, que reduce sustancialmente la absorción de nutrientes y agua, con el consiguiente debilitamiento de la planta y disminución del rendimiento (Orton Williams, 1973; Siddiqi, 2000; Abad, *et al.*, 2003). Además, los efectos negativos de *Meloidogyne* se agravan en algunas ocasiones por interacciones con otros patógenos. Los síntomas más comunes e indirectos son la reducción del crecimiento, clorosis del follaje, susceptibilidad al marchitamiento y menor producción de frutos. La mayoría de especies de *Meloidogyne* inducen a la raíz infectada a engrosarse alrededor del punto donde el nematodo se está alimentando, formándose así el típico nódulo radicular. Los nódulos pueden presentarse simples, o varios de ellos coalescen para formar un conjunto masivo de nódulos. Algunas especies estimulan también a la planta a producir muchas raíces laterales que emergen de la agalla, lo que da por resultado un sistema radical compacto, anormalmente abundante y entrelazado. Aunque algunas especies producen un tipo característico de nodulación, la identificación de ellas no puede hacerse basándose solamente en estos síntomas radicales (Eisenback *et al.*, 1981).

2.4. Identificación de especies de *Meloidogyne*

Las identificaciones a nivel de especies de los nematodos formadores de agallas radicales presentan muchas dificultades. La morfología, la morfometría variable, los efectos del hospedante, la variación intraespecífica, la reproducción partenogenética, la existencia de especies crípticas y el número cada vez mayor de especies descritas, generan confusión y limitan la identificación de especies de *Meloidogyne* que dependen predominantemente de una estrategia reproductiva partenogenética (Hunt y Handoo, 2009).

La verificación de poblaciones mixtas y/o la detección de especies poco comunes requiere técnicas de identificación distintas a la prueba de hospedantes diferenciales, que incluyen las morfológicas (patrón perineal de hembras adultas, machos, forma de la región labial del J2 y hembra, morfología del estilete, longitud y forma de la cola del J2) y, en algunos casos, métodos bioquímicos o moleculares. Con el aumento del número de especies descritas los valores de muchos de estos caracteres han demostrado una gran variación intraespecífica. La técnica de la electroforesis de isoenzimas ha permitido identificar otras especies no comunes, aunque son los métodos moleculares basados en la PCR los que actualmente vienen contribuyendo a una correcta y mejor identificación de nuevas especies (Hunt y Handoo, 2009).

2.4.1. Uso de patrones perineales

El patrón perineal comprende el área del extremo de la cola, fasmidios, líneas laterales, ano y vulva; todo rodeado por pliegues o estrías cuticulares. Los caracteres morfológicos del patrón perineal usados en la identificación son: forma del diseño perineal (rectangular, circular, oval, piriforme, de reloj de arena, etc.), arco dorsal (alto, bajo redondeado, aplanado), líneas laterales (presentes o ausentes), forma de las estrías (finas, gruesas, cortas, quebradas, lisas, onduladas, en zigzag), hombreras (presentes o ausentes), puntuaciones al término de la cola (presentes o ausentes), alas en uno o a ambos lados del diseño (presentes o ausentes). Aunque los patrones perineales de individuos y poblaciones dentro de una especie varíen, las características básicas de cada especie no lo hacen (Taylor y Sasser, 1978; Hirschmann, 1985).

2.4.2. Análisis electroforéticos de proteínas e isoenzimas

La caracterización enzimática, es un método descrito para identificar a las hembras de diversas especies de *Meloidogyne* mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Varios perfiles isoenzimáticos se han utilizado para distinguir las especies de *Meloidogyne*, la carboxilesterasa / esterasa EST (EC 3.1.1.1) resulta la más útil, otras como malato deshidrogenasa MDH (1.1.1.37), superóxido dismutasa SOD (1.15.1.1) y glutamato oxaloacetato, transaminasa GOT (EC 2.6.1.1) también se utilizan para confirmar la identificación de especies realizadas con EST y MDH. En la electroforesis, la EST o MDH se presentan como bandas de color, las cuales son especie-específicas. Dicho método es muy sensible, ya que se necesita sólo una hembra para hacer la identificación, por lo tanto, es útil para la detección temprana de mezclas de especies. La estabilidad relativa de los fenotipos isoenzimáticos en *Meloidogyne* spp. representa una herramienta útil para la identificación del nematodo, entre los sistemas de isoenzimas, la EST tiene el valor diagnóstico más alto ya que es el fenotipo que más se ha descrito (Esbenshade y Triantaphyllou, 1985).

Los fenotipos de enzimas se designan indicando las especies de *Meloidogyne* que cada una específica y el número de bandas detectadas. Los fenotipos con el mismo número de bandas se diferencian por letras pequeñas (Esbenshade y Triantaphyllou, 1985, 1990). La comparación de perfiles electroforéticos de esterases han demostrado gran consistencia para distinguir especies de *Meloidogyne*, sin embargo, los perfiles de malato deshidrogenasa ayudan en la identificación cuando los perfiles de esterases son similares, como por ejemplo, con *M. incognita* y *M. hapla* (Williamson, 1991). Algunas 16 especies, como *M. arenaria*, muestran varios perfiles diferentes, aunque esto puede indicar de la existencia de especies crípticas (Hunt y Handoo, 2009).

CAPÍTULO 3

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Período de ejecución y ubicación geográfica de las zonas muestreadas para la obtención de poblaciones de *Meloidogyne* spp.

El trabajo de investigación se realizó entre los meses de junio de 2016 y febrero de 2017, las muestras se colectaron en algunas zonas productoras de capsicum, espárrago, alcachofa, melón y apio ubicadas en las regiones de Piura, Lambayeque y La Libertad (Cuadro 1).

Cuadro 1. Ubicación geográfica de las principales zonas productoras de los cultivos de capsicum, espárrago, alcachofa, melón y apio.

Región	Zonas productoras	Ubicación geográfica
Piura	Valle del Medio Piura	04°53'18" de latitud sur y 80°41'07" longitud oeste.
Lambayeque	Valle de Lambayeque	7°14'37" de latitud sur y 80°37'23" longitud oeste.
La Libertad	Valles de Virú	6°56'38" de latitud sur y 79°41'18" longitud oeste.

En campo, las muestras de raíces de cada cultivo se evaluaron para confirmar la presencia de las agallas típicas producidas por *Meloidogyne* spp., las cuales se codificaron de acuerdo al cultivo y lugar de procedencia.

3.2. Muestreos

La obtención de muestras se realizó en suelos con humedad (30 a 40 % de su capacidad de campo), el número de submuestras para obtener una muestra compuesta (suelo más raíces) estuvo supeditada a la superficie de cada sito o lugar de muestreo. Las submuestras se tomaron siguiendo un esquema de muestreo sistemático en forma

de V o zigzag entre las filas dentro del cultivo y a una distancia equidistante entre cada submuestra. Las submuestras se colectaron con la ayuda de una palana a una profundidad entre 20 a 30 cm colocándose en una bolsa o balde plástico. Posteriormente se mezclaron para tomar la muestra compuesta final de 1 kg más raíces (20 a 40 g). Las muestras se acondicionaron en bolsas plásticas y se etiquetaron para su traslado al laboratorio de Nematología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Piura.

3.3. Procesamiento y extracción de nematodos de muestras de suelo

Las muestras compuestas se conservaron a 10°C y se procesaron en los primeros 10 días de la fecha de toma de muestras en el campo. Para la extracción del J2 de *Meloidogyne* spp. del suelo se utilizó el método de flotación-centrifugación (Jenkins, 1964). La muestra de suelo se homogenizó para obtener 100 cm³, la cual se puso en un balde vacío, luego se agregó 1 litro de agua, se mezcló con la finalidad de desagregar los terrones y liberar de los nematodos en la suspensión. La suspensión se pasó a través de un tamiz de 20 Mesh, recogiendo en un balde. Posteriormente, la suspensión se vertió a través de un tamiz de 500 Mesh. Lo retenido sobre el tamiz de 500 Mesh se llevó a un vaso con capacidad de 100 ml, colectándose aproximadamente 40 ml. A los 40 ml se agregó una cuchara de caolín, se homogenizó y se centrifugó por 4 min a 1,750 rpm. En cada tubo se eliminó cuidadosamente el sobrenadante y se adicionó la solución de sacarosa (500 g de azúcar disuelta en 1 L de agua). Se centrifugó por segunda vez a 1,750 rpm por 2 min, vertiéndose cuidadosamente el sobrenadante en un tamiz de 500 Mesh, se lavó con agua para retirar la solución de sacarosa y luego coleccionar los nematodos en placas de vidrio para su análisis bajo el microscopio y cuantificar los nematodos presentes.

3.4. Procesamiento y extracción de huevos más J2 de *Meloidogyne* spp. de raíces

Se aplicó la técnica de la trituración-centrifugación (Coolen, 1979). Las raíces se cortaron en pedazos de aproximadamente 1cm, muestras de 1 g más una solución de hipoclorito de sodio (0.5 % NaOCl) se trituraron en una licuadora por 1 min en máxima velocidad. Los restos vegetales se pasaron por un tamiz de 20 Mesh, y 500 Mesh, superpuestos uno sobre otro, se colectó con ayuda de una piseta la suspensión

de nematodos en el tamiz de 500 Mesh, los cuales se depositaron en vaso de 100 ml. La suspensión se vertió en los tubos de centrifugación y se llevó a cabo el mismo procedimiento descrito en el punto 3.3.

3.5. Aislamiento de poblaciones

3.5.1. Obtención de poblaciones en plantas de tomate

Como hospedante susceptible se utilizó el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* var. Río grande). Se sembraron semillas en bandejas de germinación conteniendo turba esterilizada, las plantas se mantuvieron por un periodo de 15 días o hasta cuando tuvieron 4 hojas verdaderas. Luego se trasplantaron en macetas plásticas de 1000 cm³ conteniendo una mezcla de suelo naturalmente infestado que quedó después de realizar el procedimiento del punto 3.3., más restos de raíces agalladas. Las plantas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero por 45 días, se abonaron cada siete días con un fertilizante balanceado (20-10-20) soluble en agua. Huevos y juveniles en segundo estado (J2) del nematodo se extrajeron de las plantas de tomate con raíces agalladas con una solución de 0.5% de NaOCl (Hussey y Barker, 1973). Este inóculo se utilizó para los ensayos de purificación de las respectivas poblaciones del nematodo.

3.5.2. Purificación de poblaciones de *Meloidogyne* spp.

Para la purificación de cada población del nematodo se utilizó como fuente de inóculo huevos + J2 extraídos de raíces de tomate, inoculándose en plantas de tomate de 14 de días edad trasplantadas en macetas plásticas de 1000 cm³ conteniendo una mezcla arena + tierra de almácigo (50/50) esterilizada. Las plantas inoculadas se mantuvieron por 45 días en invernadero, pasado este período se obtendrán las hembras del nematodo para realizar la observación de diseños perineales y caracterización bioquímica de poblaciones.

3.6. Observación de diseños perineales hembras de *Meloidogyne* spp.

Para la caracterización morfológica a través de la configuración de la región perineal de hembras adultas se seleccionaron agallas causadas por el nematodo. Con una aguja de punta fina se aislaron las hembras en una cantidad mínima de diez (Fig. 1 A), se colocaron en una placa Petri conteniendo una gota de ácido láctico por un periodo de 24 h. Después, se cortó el cuello de las hembras y se apretó lentamente para que salga el contenido interno de cada hembra (Fig. 1 B y C). Con mucho cuidado se realizó un corte de forma cuadrada de la región perineal (Fig. 1 D y E), cada corte perineal fue transferido a una lámina y luego se selló con esmalte incoloro y observadas al microscopio para su caracterización morfológica (Hartman y Sasser, 1985).

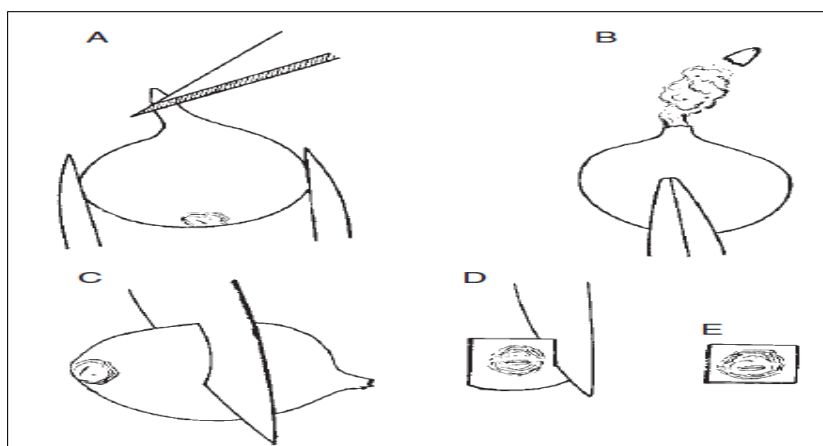


Figura 1. Procedimiento para la obtención de poblaciones de *Meloidogyne* **A:** Corte del cuello de la hembra con bisturí. **B:** Remoción del contenido interno de la hembra con una pinza. **C:** Corte de la parte anterior de la hembra **D y E:** Cortes en forma cuadrada de los perineales de la hembra para su posterior observación en microscopio (Taylor y Netscher, 1974).

3.7. Caracterización bioquímica para especies de *Meloidogyne*

Para la caracterización bioquímica se tomaron hembras adultas que al ser maduras presentan coloración blanca lechosa de las raíces agalladas de cada población de los cultivos pimiento piquillo, ají paprika, melón, apio, alcachofa y espárrago; con la ayuda de una aguja de punta fina en el microscopio estereoscópico.

Cada hembra retirada del interior de las raíces se colocó en un tubo capilar conteniendo 2 – 3 µL de solución tampón de extracción de enzima esterasa (tampón sacarosa) y mantenidas en hielo (Dalmasso & Bergé, 1978). Las masas de huevos de las respectivas hembras extraídas también se colectaron y almacenaron individualmente en micro tubos (eppendorf) conteniendo solución salina al 1% para la probable purificación de especies de *Meloidogyne* detectadas en mezcla (Carneiro *et al.*, 1996).

Después de extraídas las hembras se preparó un gel de poliacrilamida al 7% (11 x 18 cm, 1 mm de espesor), las hembras se maceraron individualmente y colocadas con ayuda de una jeringa en el papel filtro cualitativo (3 mm Whatman). Se depositó una gota de azul de bromofenol (0,01 %) en la primera, media y última muestra del respectivo gel. Después de la aplicación de la muestra, el gel se colocó en una cuba a una fuente de 80 voltios, manteniéndose en refrigeración a 5°C (Carneiro y Almeida, 2001). Después de la migración de 5 cm del azul de bromofenol en el gel (2 horas), la potencia se apaga y el gel, se sometió a la enzima esterasa, utilizando una solución de 50 ml de tampón fosfato (50 mg de Fast Blue RR sal y 1,5 ml de α –naftil acetato 1%). Luego, el material se llevó a la incubación, donde permaneció en una estufa a 37°C durante unos 20 a 30 minutos hasta que las bandas esterásticas (oscuras) aparecieron sobre fondo claro. Posteriormente los geles se transfirieron a una solución que contenía 10% de ácido acético y una solución de alcohol metílico 40 % por 30 min. Después de la fijación, los geles se colocaron entre dos hojas de papel de celofán y se secaron a temperatura ambiente.

La identificación de fenotipos se realizó mediante el cálculo de la movilidad relativa (Rm) de cada banda polimórfica de la primera banda de *M. javanica* Est. J3 (1.00, 1.23, 1.40) (Carneiro y Almeida, 2001). Los fenotipos enzimáticos encontrados se identificaron por una letra y un número que corresponden a la inicial del nombre específico del cultivo junto con el número de bandas, respectivamente (Esbenshade y Triantaphyllou, 1985; 1990). La aparición de diferentes fenotipos se expresa en porcentaje.

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Obtención de poblaciones de *Meloidogyne* spp.

Se colectaron 9 muestras de raíces y suelo de plantas de esparrago, ají, pimiento, alcachofa, melón y apio en diferentes zonas productoras de las regiones de Piura, Lambayeque y La Libertad, ubicados geográficamente en la costa norte del Perú (Fig. 2, 3 y 4). En todas las muestras colectadas se observaron raíces parasitadas (Fig. 5 y 6) por el nematodo formador de agallas *Meloidogyne* spp., estimándose diferentes niveles de infestación en suelo e inóculo (huevos + J2) en raíces de (Cuadro 2). Las plantas afectadas por el nematodo presentaban síntomas de menor crecimiento, amarillamiento en toda el área foliar seguido de un secamiento de hojas y menor cantidad y calidad de frutos (Fig. 5 y 6).

Cuadro 2. Niveles de infestación en suelo e inóculo en 9 poblaciones de *Meloidogyne* spp. procedentes de cultivos hortícolas en diferentes zonas de la costa norte del Perú.

Muestra	Procedencia	Sector	Cultivo	N° de individuos/ 100 cm ³ de suelo	Huevos + J2/g de raíces
1	Chulucanas - Piura	La Matanza	Melón	180	3120
2	Chulucanas - Piura	La Matanza	Melón	47	2900
3	Laredo- La Libertad	Barraza	Apio	5	760
4	Chulucanas - Piura	Huápalas	Paprika	70	400
5	Lambayeque	Jayanca	Piquillo	520	2100
6	Medio Piura	Chapairá	Piquillo	110	800
7	Medio Piura	Terela	Piquillo	150	610
8	Valle de Viru - La Libertad	Virú	Alcachofa	13	2140
9	Valle de Viru - La Libertad	Virú	Esparrago	11	2700

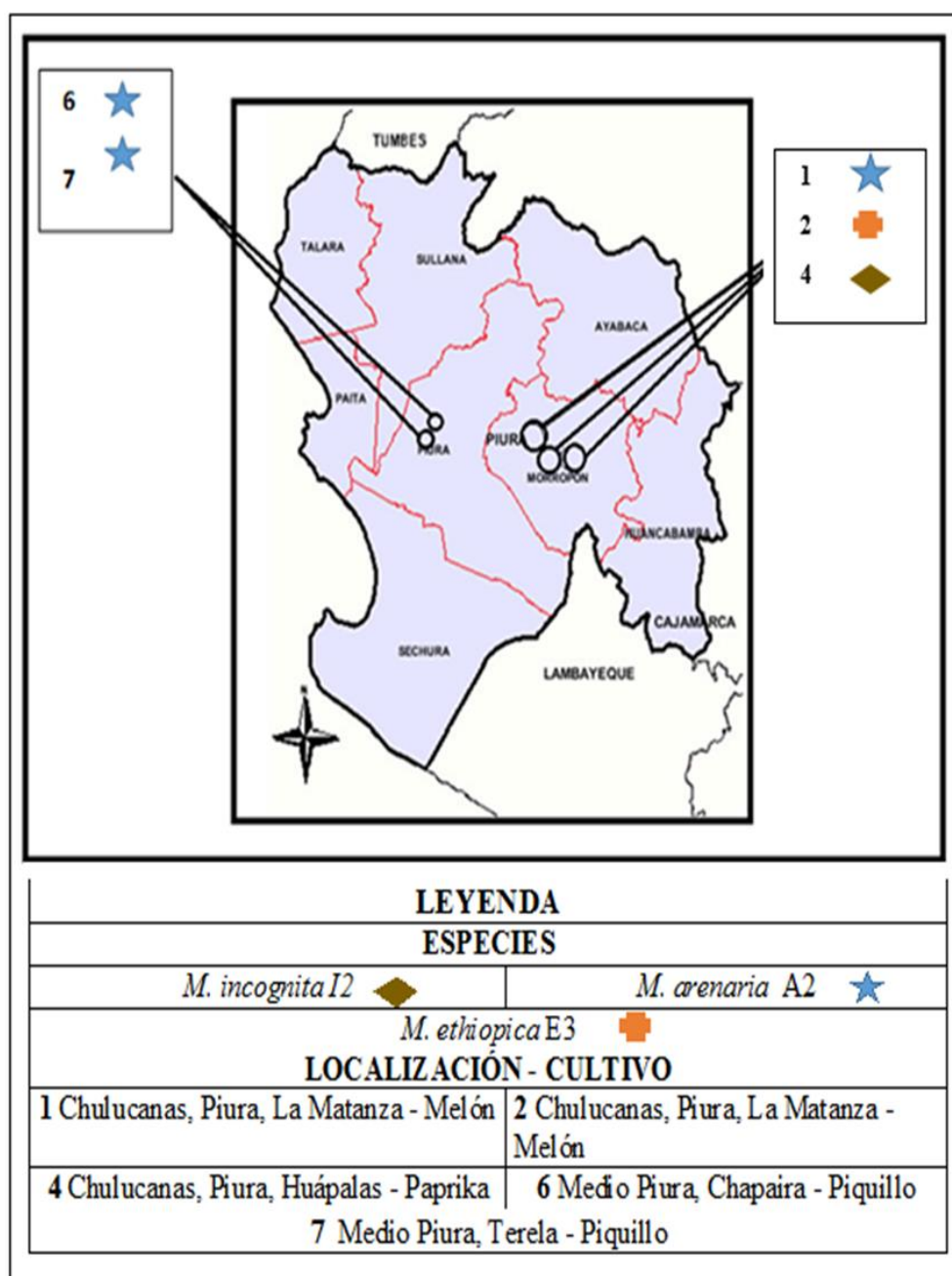


Figura 2. Localización y distribución de especies de *Meloidogyne* en los cultivos de melón, pimiento piquillo y páprika en diferentes sectores productores de la región Piura.

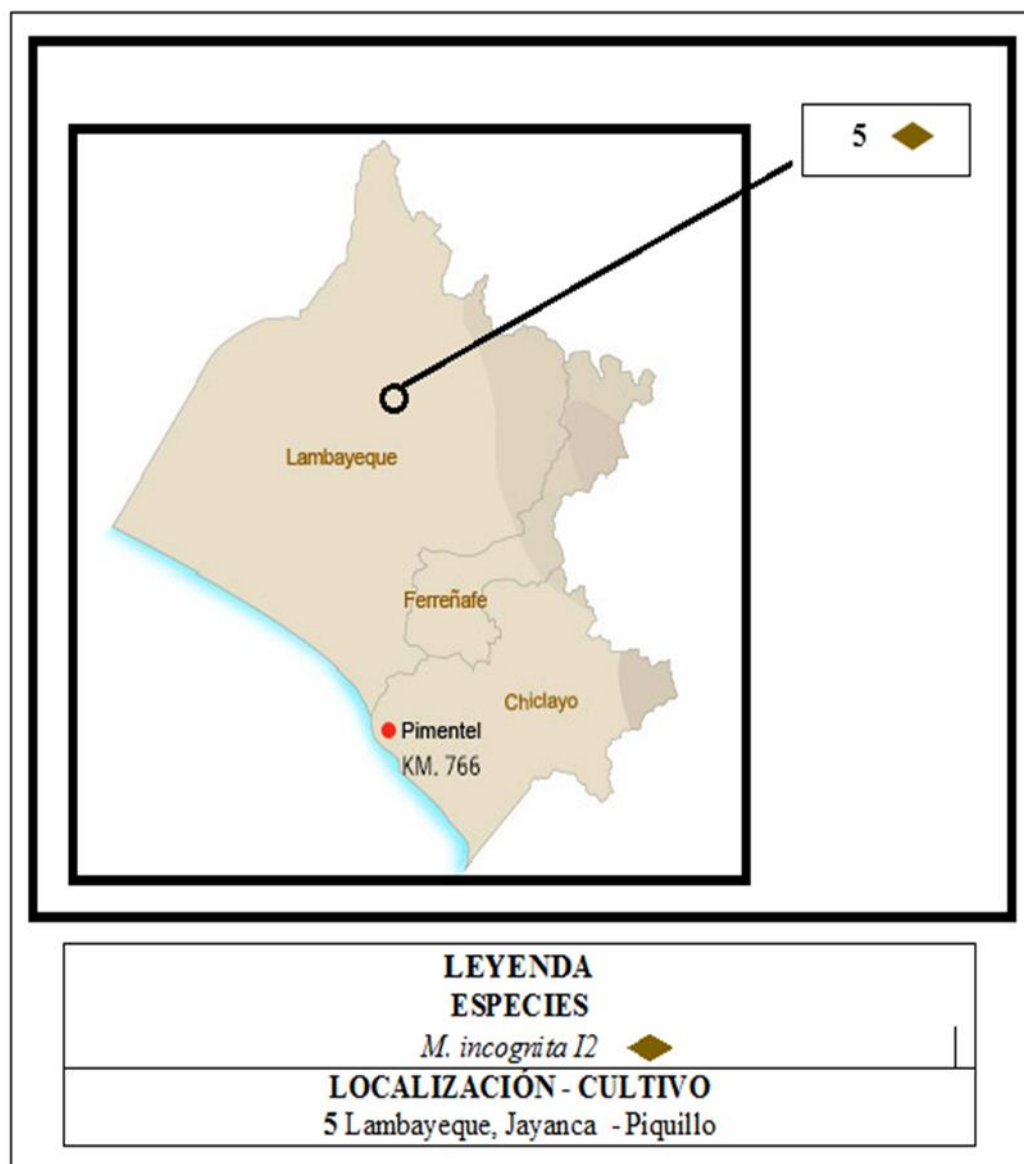


Figura 3. Localización y distribución de *M. incognita* en el cultivo de pimiento piquillo en la región Lambayeque.

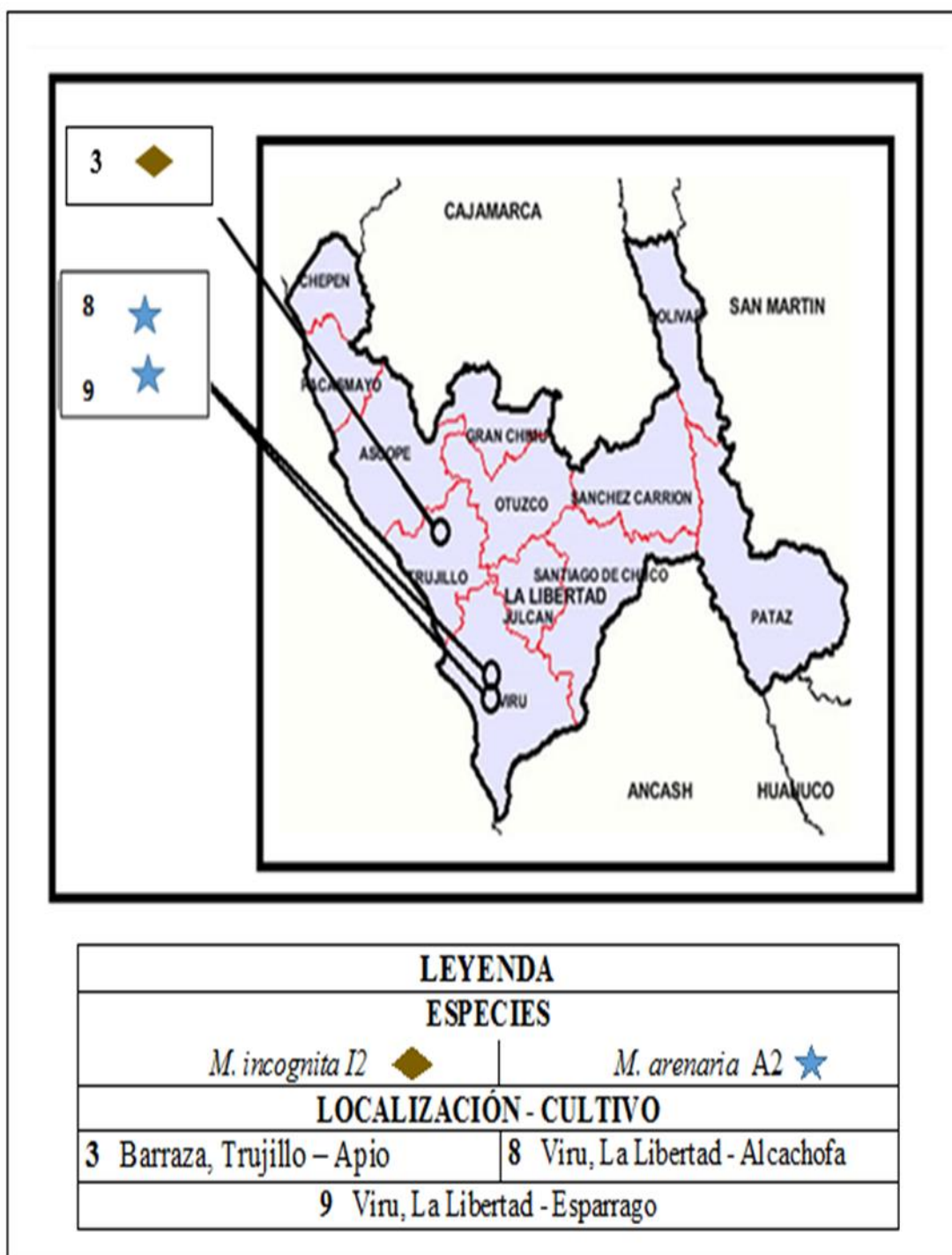


Figura 4. Localización y distribución de especies de *Meloidogyne* en los cultivos de espárrago y alcachofa en la región La Libertad.

Se obtuvieron 9 poblaciones de *Meloidogyne* spp., la caracterizaron bioquímicamente de estas poblaciones detectaron tres fenotipos esterásicos procedentes de las diferentes zonas muestreadas (Cuadro 3, Fig.4 y 5).



Figura 5. Plantas de alcachofa (a), aj páprika (b) y espárrago (c); presentando síntomas de amarillamiento en hojas, menor crecimiento y agallas en raíces causadas por *Meloidogyne* spp.



Figura 6. Plantas de apio (a) y melón (b), presentando síntomas de amarillamiento en hojas, menor crecimiento y agallas en raíces causadas por *Meloidogyne* spp.

4.2. Caracterización bioquímica

Tres fenotipos de esterasa se identificaron en los cultivos de melón, apio, páprika, piquillo, alcachofa y espárrago (Fig. 7 y 8). El fenotipo A2 (Rm: 1.2, 1.3) t  pico de *M. arenaria* se detectó en el 55.6 % de muestras, el fenotipo E3 (Rm: 0.9, 1.06, 1.0) correspondiente a *M. ethiopica* se detectó en el 11.1 % de muestras y el fenotipo I2 (Rm: 1.0, 1.1) de *M. incognita* en el 33.3 % de muestras.

Cuadro 3. Fenotipos isoenzimáticos de esterasa observados en 9 poblaciones de *Meloidogyne* spp. provenientes de plantas de cultivos hortícolas colectados en diferentes zonas de la costa norte del Perú.

Muestra	Procedencia	Cultivo	Especie	Fenotipo esterasa
1	Chulucanas, Piura, La Matanza	Melón	<i>M. arenaria</i>	A2
2	Chulucanas, Piura, La Matanza	Melón	<i>M. ethiopica</i>	E3
3	Barraza - La Libertad	Apio	<i>M. incognita</i>	I2
4	Chulucanas, Piura, Huápalas	Paprika	<i>M. incognita</i>	I2
5	Lambayeque, Jayanca	Piquillo	<i>M. incognita</i>	I2
6	Medio Piura, Chapaira	Piquillo	<i>M. arenaria</i>	A2
7	Medio Piura, Terela	Piquillo	<i>M. arenaria</i>	A2
8	Viru - La Libertad	Alcachofa	<i>M. arenaria</i>	A2
9	Viru - La Libertad	Esparrago	<i>M. arenaria</i>	A2

M. arenaria se detectó asociada al cultivo de melón en la zona de Chulucanas, Piura (04° 53'18" S, 80° 41' 07" O), pimiento piquillo en el valle del Medio Piura, Piura (04° 53'18" S, 80°41'07" O), alcachofa y espárrago en el valle de Virú, La libertad (6°56'38"S, 79°41'18" O). *M. ethiopica* sólo se identificó en el cultivo de melón en la zona de Chulucanas, Piura (04°53'18"S, 80°41'07"O). *M. incognita* se observó asociada al cultivo de apio en el sector Barraza, La libertad (6°56'38" S, 79°41'18" O), ají páprika en la zona de Chulucanas, Piura (04° 53'18" S, 80° 41' 07" O) y pimiento piquillo en Lambayeque (7°14'37" S y 80°37'23" O).

En muchos países productores de melón las especies de *Meloidogyne* son reconocidas como serios parásitos que afectan la producción de este cultivo (Park *et al.*, 1995; Kwon *et al.*, 1998), las plantas muy afectadas mueren o producen menos frutos. Kim y Ferris (2002), concluyeron que *M. arenaria* es la especie más común e importante que afecta al melón oriental en Korea. En la presente investigación, *M. arenaria* y *M. ethiopica* se encontraron asociadas en el cultivo de melón procedente del sector Chulucanas en la región Piura. *M. ethiopica* presenta amplia distribución en muchos países del este y sur del África, Sudamérica (Chile y Brasil) y algunos países de Europa y Oceanía (Hunt y Handoo, 2009; Sirca *et al.*, 2004; Conceicao, *et*

al., 2012) y los hospedantes más comunes de *M. ethiopica* son los cultivos de uva, kiwi, soya y caña de azúcar. En Perú, Murga-Gutierrez *et al.* (2012) reportaron por primera vez *M. ethiopica* asociado al cultivo de espárrago procedente de las zonas productoras de Virú, región de La Libertad en el norte del Perú; no habiéndose encontrado reportes como un parásito de melón.

Dos poblaciones obtenidas de pimiento piquillo procedentes del valle del Medio Piura se identificaron como *M. arenaria* y la población obtenida de ají páprika originaria del distrito de Chulucanas se identificó como *M. incognita*. La población obtenida de piquillo en el distrito de Lambayeque correspondió a *M. incognita*. (Cuadro 3). Se conoce que los nematodos más importantes que afectan pimientos (*Capsicum annuum*) dulces y picantes en los trópicos y subtrópicos del mundo son: *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. floridensis* y *M. mayaguensis* (= *M. enterolobii*) (Sikora y Fernández, 2005). En las condiciones del norte del Perú se demuestra que *M. incognita* y *M. arenaria* son las más comunes y diseminadas en las dos variedades de *C. annuum* muestreadas, asimismo los síntomas que causan a estos cultivos son agresivos que afectan su producción, lo cual coincide con distintas investigaciones realizadas en otras regiones del mundo (Di Vito *et al.*, 1992; Thomas, 1994).

Pocos reportes se han publicado sobre especies de *Meloidogyne* asociadas al cultivo de apio *Apium graveolens*, *M. hapla* es la más común y la que ocasiona mayor daño en la producción (Doucet y Pinochet, 1992; Melakeberhan y Wang, 2012), es este estudio en la única muestra evaluada y procedente de la región la Libertad se identificó *M. incognita*.

En los Estados Unidos, Dudash y Barker (1992) observaron bajo condiciones de invernadero y campo que varios cultivares de espárrago se comportaron como buenos hospedantes de *M. arenaria* raza 2 y *M. incognita* raza 1 y 4. En el Perú, *M. incognita* y *M. ethiopica* se han encontrado asociados al espárrago en la región La Libertad (Murga-Gutierrez *et al.*, 2012), estos autores indican que hacen falta más investigaciones para demostrar la patogenicidad de *M. ethiopica* sobre este cultivo. En la presente investigación sólo se identificó a *M. arenaria*, la cual causa un severo agallamiento sobre raíces absorbentes y amarillamiento generalizado en el área foliar

lo que causa disminución en los rendimientos del cultivo (Fig. 5c), lo que coincide con los resultados de Dudash y Barker (1992).

En el mundo, existe poca información de las especies de los nematodos formadores de agallas radiculares asociados a alcachofa. En Italia, el mayor productor mundial de esta hortaliza se reporta que *M. incognita* es la especie que más daño produce en este cultivo (Di Vito y Botta, 1976). En este estudio *M. arenaria* es la especie asociada a alcachofa y por la sintomatología observada en el campo (Fig. 5a), indica que es un patógeno que causa daños significativos al cultivo.

De acuerdo al mayor porcentaje de detección de especies se considera que *M. arenaria* y *M. incognita* son las especies de mayor predominancia y distribución en las distintas zonas geográficas y asociadas a cultivos hortícolas en la costa norte del Perú.

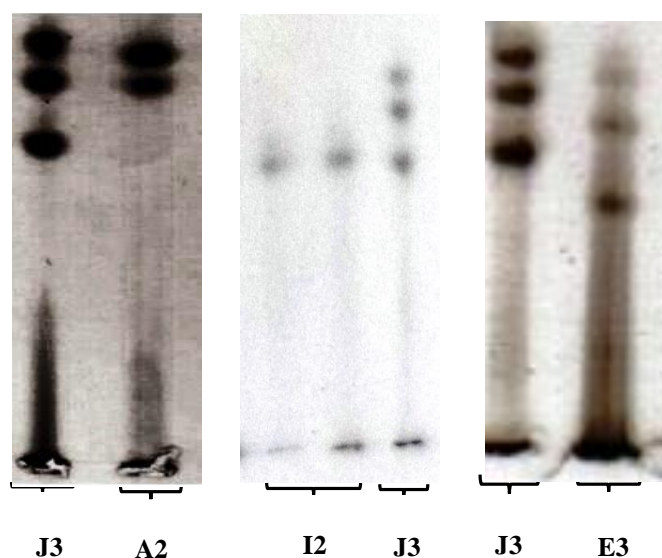


Figura 7. Fenotipos de esterasa detectados en 9 poblaciones de *Meloidogyne* spp. provenientes de los cultivos de melón, pimiento, ají, apio, alcachofa y espárrago de diferentes regiones geográficas de la costa norte del Perú. *M. javanica* (J3); *M. arenaria* (A2), *M. incognita* (I2) y *M. ethiopica* (E3).

Nº Banda	Rm	<i>M. javanica</i>	<i>M. arenaria</i>	<i>M. incognita</i>	<i>M. ethiopica</i>
1	0.9	8			
2	1.0		7		
3	1.06	6			
4	1.1		5		
5	1.2				
6	1.25			4	
7	1.3				3
8	1.40	2		2	2
					1
Est		J3	A2	I2	E3

Figura 8. Fenotipos de esterasa (Est) detectados en 9 poblaciones de *Meloidogyne* spp. aisladas de los cultivos de melón, pimiento, ají, apio, alcachofa y espárrago de diferentes regiones geográficas de la costa norte del Perú.

4.3. Caracterización morfológica

La configuración de la región perineal de las poblaciones caracterizadas como *M. incognita* Est. I2 presentan arco dorsal alto y trapezoidal, estrías onduladas y bifurcación en la región de los campos laterales, características típicas de la especie (Fig. 9A y B). La configuración perineal de las poblaciones Est. A2 presentan arco dorsal bajo, de trapezoidal a redondo, líneas laterales presentes y visibles. Las estrías cuticulares de la región dorsal poco onduladas, cortas, configuración perineal semejante a *M. arenaria* (Fig. 9C). *M. ethiopica* Est. E3 presentan un patrón perineal de redondo a cuadrado, arco dorsal moderadamente alto, estrías gruesas y separadas, lisas a onduladas (Fig. 9D) (Hunt y Handoo, 2005).

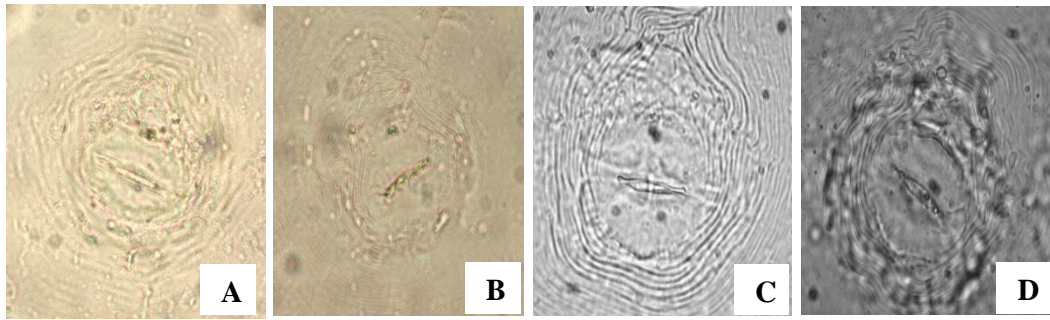


Figura 9. Patrones perineales de tres especies de *Meloidogyne*. A, B: *M. incognita*; C: *M. arenaria* y D: *M. ethiopica*; detectadas en diferentes regiones geográficas y cultivos hortícolas en la costa norte del Perú.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES

- a. Se identificaron tres especies de *Meloidogyne* asociadas a diversos cultivos hortícolas en la costa norte del Perú. *M. arenaria*, con fenotipo A2 es la especie más frecuente, seguida de *M. incognita* con fenotipo I2 y *M. ethiopica* con el fenotipo E3.
- b. *M. ethiopica* y *M. arenaria* se encuentran asociadas al cultivo de melón procedente de las poblaciones obtenidas en el distrito de Chulucanas, Piura.
- c. *M. incognita* se encuentra asociada al cultivo de apio procedente de la población obtenida en el distrito de Trujillo, La Libertad.
- d. En los cultivos de capsicums procedentes de las regiones de Piura y Lambayeque se identificaron *M. incognita* y *M. arenaria*.
- e. En los cultivos de alcachofa y espárrago procedentes de la región La Libertad sólo se identificó *M. arenaria*.

CAPÍTULO 6

6. RECOMENDACIONES

- a. Realizar ensayos de patogenicidad para determinar los niveles de severidad de las diversas especies de *Meloidogyne* identificadas en los cultivos de melón, esparrago, apio y capsicums
- b. Realizar muestreos nematológicos en otros cultivos hortícolas y áreas geográficas del norte del Perú para estimar la ocurrencia, distribución y abundancia de especies de *Meloidogyne*.
- c. Aislar poblaciones de *Meloidogyne* spp. en otros cultivos hortícolas y áreas geográficas del norte del Perú para identificar especies asociadas.

CAPÍTULO 7

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abad, P., Favery, B., Rosso, M., and Castagnone-Sereno, P. 2003. Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. *Molecular PlantPathology*4: 217–224.

Abad, P; Castagnone-Sereno, P., Rosso, M.N., De Almeida, J., and Favery, B. 2009. Invasion, feeding and development. In Perry, RN; Moens, M; Starr, JL. eds. Root-knot nematodes. London, UK. CAB International. p. 163-176.

ADEX, Asociación de Exportadores 2014. Cultivo de capsicum alcanzará las 12,000 hectáreas este año. Disponible en: <http://rpp.pe/economia/economia/>.

Carneiro, R.M.D.G. & Almeida. M.R.A. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides das galhas para identificação de espécies. *Nematologia Brasileira*. V.25, n.1, p.35 – 44,

Carneiro, R.M.D.G; Almeida, M.R.A., and Carneiro, R.G. 1996. Enzyme phenotypes of Brazilian populations of *Meloidogyne* spp. *Fundamental and Applied Nematology*, v.19, n. 6, p.555 – 560.

Chitwood, D.J., and Perry, R.N. 2009. Reproduction, Physiology and Biochemistry. In Perry, R; Moens, M; Starr, J. eds. Root-knot nematodes. London, UK. CAB International. p. 182-194.

Conceicao, I.L., Tzortzakakis, E.A., Gomes, P., Abrantes, I, and da Cunha, M.J. 2012. Detection of the root-knot nematode *Meloidogyne ethiopica* in Greece. *European Journal of Plant Pathology* 134, 451–7.

Coolen, W.A. 1979. Methods for the extraction of *Meloidogyne* spp. and other nematodes from roots and soil. In: Lamberti, F. and Taylor, C.E. (eds) Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* Species) Systematics, Biology and Control. Academic Press, London, pp. 317–329.

Curtis, R., Robinson, A., and Perry, R. 2009. Hatch and host location. In Perry, RN; Moens, M; Starr, JL. eds. Root-knot nematodes. London, Uk. CAB International 139-155 p.

- Dalmasso, A., and Bergé, J.B. 1978.** Molecular polymorphism and phylogenetic relationship in some *Meloidogyne* spp. em áreas produtoras de banana no Brasil. *Nematologia Brasileira*, v.25, p.126.
- Di Vito, M., and Botta, S. 1976.** Infestazione di *Meloidogyne incognita* su carciofo in Puglia. *Nematologia Mediterranea*, 4: 237-239.
- Di Vito M., Cianciotta, V., and Zaccheo, G. 1992.** Yield of susceptible and resistant pepper in microplots infested with *Meloidogyne incognita*. *Nematropica* 22:1–6.
- Doucet, M.E., and Pinochet, J. 1992.** Occurrence of *Meloidogyne* spp. in Argentina. *Journal of Nematology* 24:765-770.
- Dudash, P.J., and Barker, K.R. 1992.** Host suitability and response of asparagus cultivars to *Meloidogyne* species and races. *Journal of Nematology* 24:109–116.
- Eisenback, J.D., Hirschmann, H., Sasser, J.N., and Triantaphyllou, A.C. 1981.** A guide to the four most common species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.), with a pictorial key. Department of Plant Pathology, North Carolina State University/USAID. North Carolina State Graphics, Raleigh.
- Esbenshade, P.R., and Triantaphyllou, A.C. 1985.** Use of enzyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 17: 6 – 20.
- Esbenshade, P.R., and Triantaphyllou, A.C. 1990.** Isozyme phenotypes for the identifications of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 22: 10 – 15.
- Evans, A., and Perry, R. 2009.** Survival mechanisms. In Perry, RN; Moens, M; Starr, J.L. Eds. *Root-knot nematodes*, London, UK. 201-219 p.
- Hartman, K. M., and Sasser, J. N. 1985.** Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: *An Advanced treatise on Meloidogyne*. Vol. II Methodolgy. (Barker, K. R., Carter, C. C., and Sasser., eds). North Carolina University Graphics, pp. 69-71.
- He, B., Magill, C., and Starr, J.L. 2005.** Laser capture microdissection and real-time PCR for measuring mRNA in giant cells induced by *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology* 37, 308–312.
- Hunt, D.J., and Handoo, Z.A. 2009.** Taxonomy, identification and principal species. In Perry, R.; Moens, M; Starr, J. eds. *Root-knot nematodes*. London, UK. CAB International. pp. 55-97.
- Hussey, R.S., and Barker, K.R. 1973.** A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57, 1025–1028.

- Hussey, R.S., and Janssen, G.J.W. 2002.** Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species. In: Starr, J.L., Cook, R. and Bridge, J. (eds) *Plant Resistance to Parasitic Nematodes*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 43–70.
- Hussey, R.S., and Mims, C.W. 1991.** Ultrastructure of esophageal glands and their secretory granules in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Protoplasma* 156:9-18.
- Hussey, R.S., and Williamson, V.M. 1998.** Physiological and Molecular Aspects of Nematode Parasitism. In Barker, K.R.; Pederson, G.A.; Windham, G.L. eds. *Plant and Nematode Interactions*. Madison, Wisconsin, USA. American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc. p. 87-108.
- Jenkins, W.R. (1964).** A rapid centrifugal flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter* 48, 692.
- Karssen, G., and Moens, M. 2006.** Root-knot nematodes. In: Perry, R.N. and Moens, M. (eds) *Plant Nematology*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 59–90.
- Kim, D.G., and Ferris, H. 2002.** Relationship Between Crop Losses and Initial Population Densities of *Meloidogyne arenaria* in Winter-Grown Oriental Melon in Korea D.G. *Journal of Nematology* 34(1):43–49.
- Kwon, T.Y., Jung, K.C., Park, S.D., Sim, Y.G., and Choi, D.S. 1998.** Cultural and chemical control of root-knot nematodes, *Meloidogyne* sp. on oriental melon in plastic film house. Rural Development Administration, *Journal of Crop Protection* 40:96–101.
- Lamberti, F. 1979.** Economic importance of *Meloidogyne* spp. in subtropical and Mediterranean climates. 341-357. In: *Root-Knot Nematodes (Meloidogyne species) Systematics, Biology and Control*. F. Lambert y C.E. Taylor, eds. Academic Press, New York.
- Melakeberhan, H., and Wang, W. 2012.** Suitability of celery cultivars to populations of *Meloidogyne hapla*. *Nematology* 14:623–629.
- Moens, M., Starr, J.L., and Perry, R.N. 2009.** *Root-knot Nematodes*. UK by the MPG Books Group. 530 p.
- Murga-Gutierrez, S.N., Colagiero, M., Rosso, L.C., Finetti Sialer, M.M., and Ciano, A. 2012.** Root-knot nematodes from asparagus and associated biological antagonists in Peru. *Nematropica* 42:57-62.

- Noe, J. and Sikora, R.A. 1990.** Effects of tropical climates on the distribution and host-parasite relationship of plant parasitic nematodes. In: Luc, M., Sikora, R.A. and Bridge, J. (eds) Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. CAB International, Wallingford, UK, pp. 583–597.
- Orton Williams, K.J. 1973.** *Meloidogyne incognita*. C.I.H. Descriptions of Plant Parasitic Nematodes, Set 2, N° 18, 4 pp.
- Park, S.D., Kwon, T.Y., Jun, H.S., and Choi, B.S. 1995.** The occurrence and severity of damage by root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in controlled fruit vegetable field. Rural Development Administration, Journal of Crop Protection 37:318–323.
- Ramsey, K., Wang, Z, and Jones, M.G.K. 2004.** Using laser capture microdissection to study gene expression in early stages of giant cells induced by root-knot nematodes. Molecular Plant Pathology 5,587–592.
- Sasser, J.N. 1980.** Root-Knotnematodes: a global menacetocroproduction. PlantDisease 64: 36-41.
- Siddiqi, M.R. 2000.** Tylenchida Parasites of Plants and Insects. CABI, UK, 833 pp.
- Sikora, R.A., and Fernández, E. 2005.** Nematode Parasites of Vegetables. In: Michel Luc, M., Sikora, R.A., and Bridge, J. (eds) Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. London, UK. CAB International, pp. 319-392.
- Sirca, S., Urek, G., and Karssen, G. 2004.** First report of the root-knot nematode *Meloidogyne ethiopica* on tomato in Slovenia. Plant Disease 88, 680.
- Taylor, A., and Sasser, J. 1978.** Biología, identificación y control de los nematodos del nódulo de la raíz. Proyecto Internacional de *Meloidogyne*. North Carolina. EE.UU.: Publicación Cooperativa entre el Departamento de Fitopatología de la Universidad del Estado.
- Taylor, D.P., and Netscher, C. 1974.** An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. .Nematologica 20. 268-269 p.
- Thomas, S. H. 1994.** Influence of 1,3-dichloropropene, fenamiphos, and carbofuran on *Meloidogyne incognita* populations and yield of chile peppers. Supplement to the Journal of Nematology 26(4S):683–689.
- Wallace, H. 1964.** The biology of plant parasitic nematodes. London, UK. Edward Arnold. 280 p.

Williamson, V.M. 1991. Molecular Techniques for Nematode Species Identification. In Nickle, WR. ed. Manual of Agricultural Nematology. New York. USA. Marcel Dekker Inc. p. 107-123.

Wyss, U., Grundler, F.M.W., and Munich, A. 1992. The parasitic behaviour of second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita* in roots of *Arabidopsis thaliana*. Nematológica 38: 98-111.

ANEXOS



Figura 10. Método de la flotación y centrifugación para extracción de nematodos de muestras de suelo.

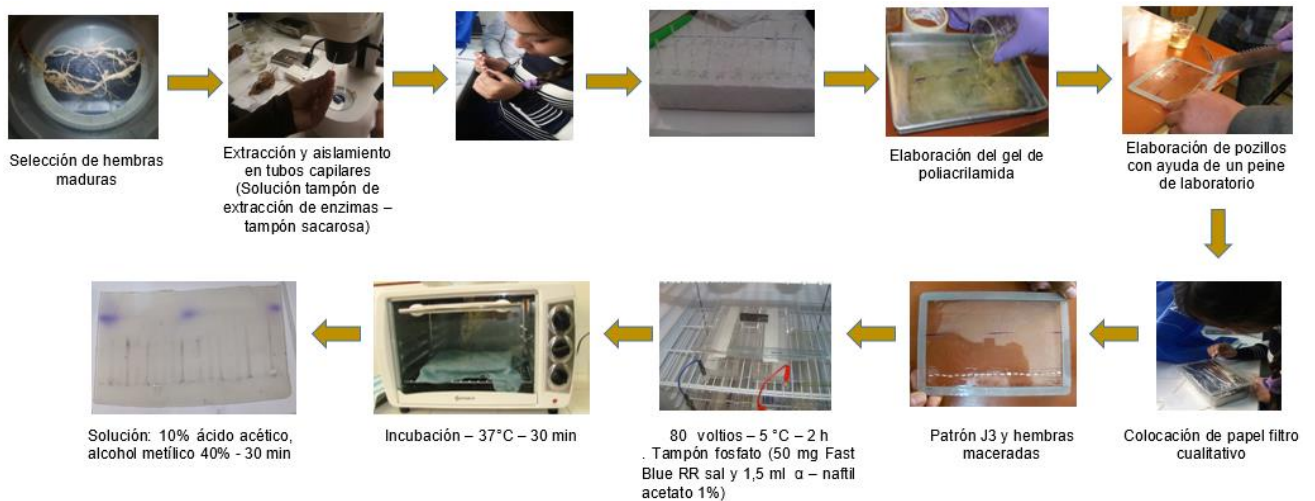


Figura 11. Procedimiento para caracterización bioquímica para especies de *Meloidogyne*.